

不同品种忍冬 ANR 基因克隆、表达模式及原核表达分析

余永亮¹, 鲁丹丹¹, 谭政委¹, 杨红旗¹, 李磊¹, 许兰杰¹, 杨青¹, 董薇¹,
安素妨¹, 郭水柱², 高松², 梁慧珍^{1*}

(1. 河南省农业科学院芝麻研究中心, 河南 郑州 450002; 2. 仲景宛西制药股份有限公司, 河南 南阳 474550)

摘要: 花青素还原酶 (anthocyanidin reductase, ANR) 是黄酮合成途径中的关键酶, 该酶的催化活性对花青素含量有重要的调控作用。本研究根据忍冬转录组数据, 设计特异性引物, 克隆忍冬和红白忍冬 ANR 基因的 CDS、gDNA 及启动子序列。结果表明, 从忍冬和红白忍冬克隆得 *LjANR* 和 *rLjANR* 的 CDS 序列均为 1 002 bp, gDNA 序列分别为 2 017 和 2 026 bp, 启动子序列分别为 1 170 和 1 164 bp。 *LjANR* 和 *rLjANR* 均含有 6 个外显子和 5 个内含子, 外显子长度一致, 内含子差异较大, 二者启动子序列中均含有大量光响应、激素应答、非生物胁迫应答元件。生物信息学分析发现, *LjANR* 和 *rLjANR* 均编码 333 个氨基酸, 均为稳定的疏水性蛋白, 无跨膜结构, 无信号肽, 二级结构主要由 α -螺旋和无规卷曲组成。序列比对及系统进化分析表明, *LjANR* 和 *rLjANR* 蛋白与猕猴桃、茶树、油茶聚为一类, 亲缘关系较近。qRT-PCR 分析发现, *LjANR* 和 *rLjANR* 均在花蕾中表达量最高, 根中表达量最低, 不同花期的表达量变化模式相似, S1 和 S2 期表达量较高, 然后表达量逐渐下降, 至 S4 期达到最低, 之后在 S5 期有一个缓慢的上升后表达量再次下降, 两个品种中 ANR 基因的表达量在根、S2、S5 期差异显著, 茎、花蕾、S1、S3、S6 期差异极显著。将 *LjANR* 基因构建到原核表达载体 pET-32a 上进行诱导表达, 在 59 kD 处成功表达出目的蛋白。该研究为进一步研究 ANR 基因的功能奠定了基础, 同时也为忍冬新品种的选育提供理论指导。

关键词: 忍冬; 花青素还原酶; 基因克隆; 表达模式; 原核表达

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)11-3449-12

Cloning and expression analysis of ANR genes from different species of *Lonicera japonica* Thunb.

YU Yong-liang¹, LU Dan-dan¹, TAN Zheng-wei¹, YANG Hong-qi¹, LI Lei¹, XU Lan-jie¹,
YANG Qing¹, DONG Wei¹, An Su-fang¹, GUO Shui-zhu², GAO Song², LIANG Hui-zhen^{1*}

(1. Henan Sesame Research Center, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;

2. Zhongjing Wanxi Pharmaceutical Co., Ltd., Nanyang 474550, China)

Abstract: Anthocyanidin reductase (ANR) is one of the key enzyme in the flavonoid biosynthetic pathway, and its catalytic activity is important for the synthesis of plant anthocyanin. In this study, specific primers were designed according to the transcriptome data of *Lonicera japonica* Thunb., and the CDS, gDNA and promoter sequences of ANR genes from *Lonicera japonica* Thunb. and *Lonicera japonica* Thunb. var. *chinensis* (Wats.) Bak. were cloned. The results showed that the CDS sequences of *LjANR* and *rLjANR* were 1 002 bp, the gDNA sequences were 2 017 and 2 026 bp respectively, and the promoter sequences were 1 170 and 1 164 bp respectively. *LjANR* and *rLjANR* both contain 6 exons and 5 introns, which have the same length of exons and large differences

收稿日期: 2023-05-10; 修回日期: 2023-08-21.

基金项目: 河南省重大科技专项 (221100310400); 河南省科技攻关项目 (222102110379, 232102110198, 222102110466, 232102110243, 232102110262); 中央本级重大增减支项目 (2060302); 河南省农科院自主创新专项基金 (2023ZC083); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助 (CARS-21); 河南省农科院新兴学科发展专项 (2023XK03).

*通讯作者 E-mail: lhzh66666@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0608

in introns. The promoter sequences both contain a large number of light response, hormone response and abiotic stress response elements. Bioinformatics analysis showed that both *LjANR* and *rLjANR* encoded 333 amino acids and were predicted to be stable hydrophobic proteins without transmembrane segments and signal peptides. The secondary structures of *LjANR* and *rLjANR* were predicted to be mainly consisted of α -helix and random coil. Sequence alignment and phylogenetic analysis showed that *LjANR* and *rLjANR* had high homology with *Actinidia chinensis* var. *chinensis*, *Camellia sinensis* and *Camellia oleifera*, and were closely related to them. The expression levels of *LjANR* and *rLjANR* were the highest in flower buds and the lowest in roots. The expression patterns at different flowering stages were similar, with higher expression levels in S1 and S2 stages and then gradually decreased until reaching the lowest level in S4 stage, after a slow increase in S5 stage, the expression levels decreased again. The expression levels of *ANR* genes in the two varieties showed significant differences in roots, S2 and S5 stages, while the differences in stems, flower buds, S1, S3 and S6 stages were extremely significant. The prokaryotic expression vector pET-32a-*LjANR* was constructed for protein expression. The target protein was successfully expressed of about 59 kD. This study lays a foundation for further study on the function of *ANR* gene and provides theoretical guidance for breeding new varieties of *Lonicera japonica* Thunb.

Key words: *Lonicera japonica* Thunb.; anthocyanidin reductase; gene cloning; expression pattern; prokaryotic expression

金银花为忍冬科忍冬属植物忍冬 (*Lonicera japonica* Thunb.) 的干燥花蕾或待开放的花^[1], 是传统的中药材, 具有抗菌、抗炎、抗病毒、抗氧化、抗内毒素、降血脂、解热等生物活性^[2,3]。药理研究表明, 其主要有效成分是绿原酸、木犀草苷和环烯醚萜类化合物等^[4], 可用于治疗关节炎、糖尿病、发烧、感染、溃疡和肿胀等^[1], 也是 SARS 冠状病毒, 甲型流感病毒、新型冠状病毒的重要抗病毒药物^[5-7]。红白忍冬 [*Lonicera japonica* var. *chinensis* (Wats.) Bak.] 是忍冬的自然突变种, 其花蕾、叶、茎均为紫红色, 花红色。和忍冬相比, 红白忍冬中木犀草苷、槲皮素、绿原酸、花色苷含量更高, 挥发油种类更多^[8,9], 因此比忍冬更香, 且其花期长, 开花时间早, 因此具有较高的观赏价值, 集药用、观赏、绿化于一体。

花青素又称花色素, 是一种重要的水溶性黄酮类化合物, 自然界中已发现的花青素有 700 多种, 而食物中有 6 种花青素是比较重要的, 包括天竺葵色素、矢车菊色素、飞燕草色素、芍药色素、牵牛花色素和锦葵色素^[10]。花青素不仅赋予水果、蔬菜和花卉红色、紫色和蓝色等不同的颜色^[11], 提高植物的观赏性, 还可以促进昆虫授粉和种子传播, 提高植物抵抗病毒、细菌等生物胁迫的能力, 清除非生物胁迫下过量的活性氧, 提高植物的抗性^[12]。此外, 花青素对人体健康也有很大的帮助, 能预防心血管疾病、糖尿病和癌症等^[13]。因此, 花青素已广泛应用于食品、保健品、化妆品、医药等领域, 花青素合成的研究也逐渐受到广大科研者的关注, 如何利用分子生物学技术提高植物花青素的含量, 培育花青素含量高的新品种成为了科研界的热点问题。

花青素还原酶是花青素合成下游的一种关键酶,

它可以在 NADPH 或 NADH 存在的条件下将有色的花青素还原合成表没食子儿茶素、表儿茶素等, 进一步聚合形成无色的原花青素, 是一种依赖 NADPH-和/或 NADH-的酶^[14,15]。Xie 等^[16]克隆了第一个花青素还原酶基因, 发现该酶是由 *BANYULS* (*BAN*) 基因编码的, 并验证了该基因可以抑制类黄酮物质的积累。Lei 等^[17]从舒茶早叶片中克隆了两个 *ANR* 基因 *CssANRa* 和 *CssANRb*, 发现这两个基因在烟草中的过表达可以导致花中原花青素的形成和花青素的减少。Li 等^[18]将两个海棠 *ANR* 基因导入烟草中过表达, 促进了原花青素的积累, 该研究还发现槲皮素、花青素和原花青素的合成在海棠叶和果皮发育过程中呈负相关且存在竞争关系。以上表明, 花青素还原酶对花青素在植物组织中的积累具有重要调控作用, 因此对花青素还原酶调控机制的研究有利于从基因水平改善植物的品质。

目前已经在艾纳香^[19]、越橘^[20]、银杏^[21]、香椿^[22]、红花^[23,24]等植物中成功克隆了 *ANR* 基因, 并进行了生物信息学及表达分析, 忍冬中的研究大多集中在鉴定和定量分析花青素类化合物及上游结构基因, 如 Yuan 等^[8]分析鉴定了红白忍冬中 8 种不同的花青素, 并克隆比较了忍冬和红白忍冬中的 *DFR* (dihydroflavanol 4-reductase, 二氢黄酮醇-4-还原酶)、*LDOX* (leucoanthocyanidin dioxygenase, 无色花青素双加氧酶) 等基因。Xue 等^[25]通过转录组学和靶向代谢组学阐明了不同花期忍冬花色变化的机制, 而迄今为止尚未见忍冬 *ANR* 基因的报道。本研究首次从忍冬和红白忍冬中成功克隆得到 *ANR* 基因的 CDS、gDNA 及启动子序列, 分析了其结构、启动子中的顺式作用元件, 并对其进行了生物信息学分析、多重比对及系统进化分析, 检测了它们在

不同组织及不同花期中的表达量, 构建原核表达载体并诱导表达 LjANR 重组蛋白, 为研究 ANR 基因在忍冬花青素代谢途径中的功能奠定基础, 也为忍冬新品种的选育提供理论指导。

材料与方 法

材料 供试材料忍冬和红白忍冬于 2017 年种植于河南省农业科学院现代农业研究开发基地, 经河南科技学院孟丽教授鉴定, 在自然条件下生长。于 2021 年 4~5 月, 在上述开发基地采取忍冬和红白忍冬开花时的根、茎、叶、花蕾, 并选取不同发育时期的花, 每份样品设置 3 个生物学重复, 液氮中速冻后转移至 -80 °C 冰箱中保存备用。

仪器 NanoDrop 2000 核酸蛋白分析仪 (美国 NanoDrop 公司); JY300C 型水平电泳槽 (北京君意东方电泳设备有限公司); 1658001 型垂直电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司); QIAquant 96 2plex 实时荧光定量 PCR 仪 (德国 QIAGEN 公司); 5804R 高速冷冻离心机和 Mastercycler nexus GSX1 梯度 PCR 扩增仪 (德国 Eppendorf 公司); SW-CJ-1D 洁净工作台 (江苏苏净化设备厂); Tanon 2500 凝胶成像系统 (上海天能公司)。

试剂 总 RNA 提取试剂盒 Quick RNA Isolation Kit (Lot: 2020#08)、基因组 DNA 提取试剂盒 Quick DNA Isolation Kit (Lot: 2111#22) 购自北京华越洋生物科技有限公司; 反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Lot: AJ91997A)、荧光定量试剂盒 TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (Lot: AL61804A)、胶回收试剂盒 MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 (Lot: ALG2057A)、加 A 试剂 DNA A-Tailing Kit (Lot: AL11579A)、质粒抽提试剂盒 MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.4.0 (Lot: AL61448A)、载体 pMD19-T (Lot: ALF0445A)、pET-32a (Lot: ALF2037A)、感受态细胞 DH5 α (Lot: AJ91561A)、BL21(DE3) (Lot: AJ917805A)、内切酶 BamH I (Lot: AJ91453A) 和 Xho I (Lot: AJE1013A), DL2000 Maker (Lot: AL61432A) 均购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司; 高保真酶 GenStar 2 \times SuperStar Plus PCR Mix with Loading Dye (Lot: GB081) 购自河南宝格生物技术有限公司; 无缝拼接试剂盒 Clone Express® II One Step Cloning Kit (Lot: 7E490J0) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 蛋白 Marker PM2510 (Lot: PM25112011132-7)、E \times Blue 蛋白超快染色液 (Lot: ZD305A)、新快速 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (Lot: ZD304A-1)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) (Lot: I1020)、10 \times PBS 缓冲液 (Lot: GP21030080613) 均购自北京庄盟国际生物基因科技有

限公司; 琼脂糖、琼脂粉、胰蛋白胨、氯化钠等购于上海生工有限公司。所需引物由河南尚亚生物技术公司合成。

基因组 DNA 和总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 按照北京华越洋生物公司植物基因组 DNA 提取试剂盒操作说明提取忍冬和红白忍冬叶片 DNA, 忍冬和红白忍冬根、茎、叶、花蕾及不同花期样品总 RNA 的提取参照该公司 RNA 提取试剂盒说明书。利用 1.1% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的总 RNA 的质量和完整性, NanoDrop 2000 分光光度计测定总 RNA 的浓度和纯度。选择 A260 nm/A280 nm 为 1.8~2.0, 总量 1 μ g 的总 RNA, 按照上述反转录试剂盒的说明书进行反转录合成 cDNA。

目的基因 CDS、gDNA 及启动子的克隆 以河南省农业科学院芝麻研究中心药用植物研究室构建的忍冬转录组数据库获得的 Unigene 基因序列为参考序列, 使用 Primer Premier 5 软件设计特异性引物 (表 1), 分别以忍冬和红白忍冬花瓣 cDNA 和叶片 DNA 为模板, 使用 GenStar 高保真酶进行 PCR 扩增。具体如下: CDS 扩增体系 50 μ L, 含 2 \times SuperStar Plus PCR Mix 25 μ L、cDNA 4 μ L、10 μ mol \cdot L⁻¹ 正反向引物各 3.0 μ L、ddH₂O 15 μ L, 反应程序为 98 °C 预变性 30 s; 98 °C 变性 10 s、61 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 终延伸 8 min; gDNA 扩增体系 10 μ L, 含 2 \times SuperStar Plus PCR Mix 10 μ L、DNA 1.5 μ L、10 μ mol \cdot L⁻¹ 正反向引物各 1.2 μ L、ddH₂O 6.1 μ L, 反应程序为 98 °C 预变性 30 s、98 °C 变性 10 s、61 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 终延伸 8 min; 启动子扩增体系 10 μ L, 含 2 \times SuperStar Plus PCR Mix 10 μ L、DNA 1.5 μ L、10 μ mol \cdot L⁻¹ 正反向引物各 1.2 μ L、ddH₂O 6.1 μ L, 反应程序为 98 °C 预变性 30 s; 98 °C 变性 10 s、59 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 终延伸 8 min。上述 PCR 产物分别经 1.1% 琼脂糖凝胶电泳检测分离, 切下含目的条带的胶块后, 经胶回收试剂盒回收纯化, 连接到 pMD19-T 载体上, 连接产物按照说明书上的方法转化 DH5 α 感受态细胞, 涂布于含氨苄青霉素 (Amp) 的固体 LB 培养基上, 37 °C 倒置培养 15 h 左右。从平板中挑选单克隆菌落, 通过菌落 PCR 筛选阳性克隆, 将阳性菌落重新挑入 600 μ L 含 Amp 的 LB 液体培养基中, 37 °C 200 r \cdot min⁻¹ 摇菌 6~8 h 后, 将菌液送往河南尚亚生物技术公司测序。

目的基因的生物信息学分析 将目的基因 FASTA 格式的核苷酸序列导入 DNAMAN 6.0 软件, 利用软件自带的翻译功能对目的基因编码的氨基酸序列进行预测; 使用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析目的基因编码蛋白的理化性质; 使用 Prabi (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/

Table 1 Primer sequences used in this study

Primer	Primer sequence	Usage
<i>LjANR-F</i>	ATGGCAGCTCAACAACCTACTGCGT	CDS and gDNA amplification
<i>LjANR-R</i>	TCAGTTCTGCAGTAACCCCTTTGGCC	
<i>PLjANR-F</i>	AGAGAGGGGGGAAGGAGGG	Promoter amplification
<i>PLjANR-R</i>	TACTCTCTCTATTGGCTTTCTCC	
<i>qLjANR-F</i>	ACCTACTGCGTGTGTGGGGAG	qRT-PCR
<i>qLjANR-R</i>	TCGTTTCGTCGGTTAAGTCTGCT	
<i>LjG6PD-F</i>	GACCCAACAGTTCCTGACAA	Reference gene
<i>LjG6PD-R</i>	GCTTTCCTGCCTTGAGTATAA	
<i>P32LjANR-F</i>	ACAAGGCCATGGCTGATATCGGATCCATGGCAGCTCAACAACCTACTGCGT	Prokaryotic expression
<i>P32LjANR-R</i>	CAGTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGTCAGTTCTGCAGTAACCCCTTTGGCC	

npsa_sopma.html) 预测目的基因编码蛋白的二级结构; 使用 NCBI 中的 CD-Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 对氨基酸序列的保守结构域进行分析; 运用 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 对蛋白的疏水性和亲水性进行预测。TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 进行蛋白序列的跨膜结构分析; 利用 SignalP 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/>) 对蛋白序列的信号肽进行预测; 将目的基因的 CDS 序列和基因组序列分别提交在线网站 GSDS 2.0 (<http://gsds.gao-lab.org/>) 分析基因的结构; 使用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析启动子中的顺式作用元件。通过 NCBI 数据库中的 BlastP 搜索与目的基因编码蛋白同源的其他植物 ANR 氨基酸序列, 采用 DNAMAN 6.0 软件进行氨基酸序列的多重比对分析, 并使用 MEGA 6.0 软件中的 Neighbor-joining 构建关于 ANR 蛋白的系统化进化树, 通过 Bootstrap 方法对进化树进行校验, Bootstrap 值设置为 1 000。

实时荧光定量 PCR 及表达量分析 根据测序得到的 CDS 序列的保守区域, 使用 Primer Premier 5 软件设计荧光定量引物 (表 1), 以金银花 *LjG6PD* 作为内参基因^[26]。反应体系为 10 μL : 5 μL TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 \times), 1.5 μL cDNA (10 \times), 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 正反向引物各 0.4 μL , 2.7 μL Rnase free ddH₂O。首先将相同组分混匀配成混合液, 之后分别加入不同体系中, 以保证反应条件的一致性, 再加入差异组分。反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 随后进行 45 个循环的 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s; 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s。通过仪器自带的熔解曲线程序分析监测 PCR 扩增的特异性。每个样品设 3 个生物学重复, 3 个技术重复, 通过 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 相对定量法计算目的基因的相对表达量^[27], 使用 IBM SPSS Statistics 20 软件对表达量进行差异显著性分析。

目的基因原核表达载体构建与诱导表达 对目的基因测序后的序列进行分析, 设计带有酶切位点的同

源臂正反引物。分别以原核表达载体 pET-32a 上的 BamH I 和 Xho I 酶切位点作为上下游引物的酶切位点, 如表 1 所示 P32*LjANR-F/R*。以扩增的 CDS 重组质粒为模板, 进行 PCR 扩增。扩增体系为 50 μL , 包含 2 \times SuperStar Plus PCR Mix 25 μL 、20 \times 质粒模板 2.5 μL 、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 正反向引物各 3.0 μL 、ddH₂O 16.5 μL 。反应程序为 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s、61 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 8 min。PCR 产物经 1.1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 进行切胶回收。同时用 BamH I 和 Xho I 双酶切 pET-32a 原核表达空载体, 并切胶回收。将切胶回收后的目的片段及表达载体 pET-32a 用无缝拼接试剂盒在 37 $^{\circ}\text{C}$ 连接 30 min, 将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 挑取单克隆进行菌液 PCR 检验、提取质粒并测序, 测序正确的重组质粒即为目的基因的原核表达载体。将测序正确的重组质粒转化至 BL21 (DE3) 表达感受态中, 挑取单克隆进行 PCR 验证, 阳性克隆于含有 Amp 的 LB 液体培养基 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至浑浊, 按 1:100 加到含 Amp 抗性的新 LB 培养液中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养至 OD 值为 0.4~0.8, 然后分别按如下 3 步操作: ① 加入 IPTG 至终浓度为 0.6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中振荡培养, 分别于诱导后的 2、3、4、15 h 取 1 mL 菌液, 收集菌体; ② 分别加入 IPTG 至终浓度为 0.2、0.4、0.6、1.0、2.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中振荡培养, 6 h 后分别取 1 mL 菌液, 收集菌体; ③ 加入 IPTG 至终浓度为 0.6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 于 37、25、20 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中振荡培养, 15 h 后取 1 mL 菌液, 收集菌体, 剩余菌液离心去上清后加入 5 mL 1 \times PBS 重悬菌体, 冰浴下以 3 s/10 s 超声破碎 15 min, 离心后获得目的基因的蛋白上清; 将以上收集的菌体重悬后分别进行 10% SDS-PAGE 电泳。

结果与分析

1 忍冬和紅白忍冬 ANR 基因全长 CDS 的克隆及序列分析

基于忍冬转录组数据库获得的 Unigene 基因序列

设计引物, 分别以忍冬和红白忍冬花瓣 RNA 反转录获得的 cDNA 为模板扩增 PCR, 两个品种均得到长度为 1 000 bp 左右的片段。扩增产物经回收、连接、转化、测序, 确定两个品种 ANR 基因的全长 CDS 序列均为 1 002 bp (图 1A)。

将获得的忍冬和红白忍冬 ANR 基因分别命名为 *LjANR* 和 *rLjANR*, DNAMAN 6.0 预测发现两个基因均编码 333 个氨基酸。序列比对后发现, *LjANR* 和 *rLjANR* 基因的 CDS 序列在两个品种中有 6 个碱基的差异, 以 *LjANR* 为例, 它们分别为 723 位 A→G、786 位 C→T、792 位 T→C、846 位 C→T、876 位 T→C 及 911 位 C→T,

而只有 911 位点碱基的差异导致了氨基酸的变异 (T→I) (图 2), 这一变异是否导致两个品种中花青素还原酶功能的差异, 进而影响两品种的开花特性, 需要后续进一步的功能验证。

2 *LjANR* 和 *rLjANR* 基因 gDNA 的克隆及基因结构分析

分别以忍冬和红白忍冬基因组 DNA 为模板, 利用特异性引物 *LjANR*-F/R 进行 PCR 扩增, 扩增后分别得到大约 2 000 bp 的条带 (图 1B)。将扩增产物同样进行回收、连接、转化、测序, 测序后确定两个品种 ANR 基因的 gDNA 序列分别为 2 017 和 2 026 bp。将两个品种

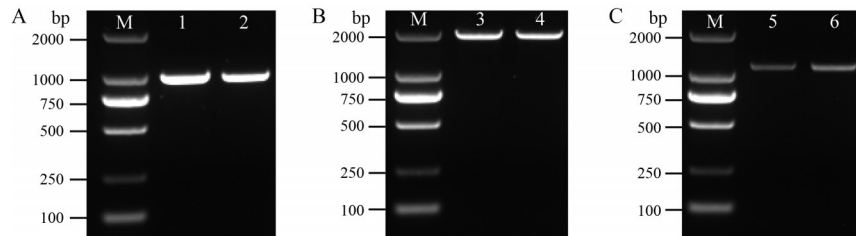


Figure 1 PCR amplification analysis of *LjANR* and *rLjANR*. A: CDS cloning results of *LjANR* and *rLjANR*; B: gDNA cloning results of *LjANR* and *rLjANR*; C: Promoter cloning results of *LjANR* and *rLjANR*; M: DL2 000 DNA marker

```

1  ATGTCAGCTCAACAACCTACTGCGTGTGTGTGGGAGGCACCGGTTTTGTTGCATCTTCGCTCATAAAGCTA
1  M A A Q Q P T A C V V G G T G F V A S S L I K L

73  TTGCTTGAGAAAAGGCTACTCTGTTAATGCCACTGTTAGAGATCCTGATAATCAGAAAAAGGTTTCTCACCTT
25  L L E K G Y S V N A T V R D P D N Q K K V S H L

145 CTAGCACTGGAGAGTTTGGGCAGCTTAAAAATCTTCAAAGCAGACTTAAACCGACGAAACGAGCTTCGATGCT
49  L A L E S L G S L K I F K A D L T D E T S F D A

217 CCTGTGACTGGCTGTGATCTAGTGTCCACGTTGCAACCCCTGTCAACTTTGATTCTCAAGATCCAGAGAAT
73  P V T G C D L V F H V A T P V N F D S Q D P E N

289 GACATGATAAAACCAGCAATCCAAGGTGTCCTCAATGTTTTAAAAGCTTGTA AAAAGCCGGAACAAAACGC
97  D M I K P A I Q G V L N V L K A C K K A G T K R

361 GTCGTTTTGACATCATCGGCAGCTACAGTATCGATCAATCAGCTCAACGGGACAGGTCTGGTTATGGATGAG
121 V V L T S S A A T V S I N Q L N G T G L V M D E

433 TCCAAGTGGAGCGATGTTGAGTTTTTACTACTGTCAAGCCACCCACTGGGGATATCCAGTCTCTAAGACA
145 S N W S D V E F L T T V K P P T W G Y P V S K T

505 CTAGCTGAAAAGGCAGCGTGGAAATTTGCTGAAGAAAATAAGATTGATCTGATTACTGTCAITTCCTAGTCTC
169 L A E K A A W K F A E E N K I D L I T V I P S L

577 ATGGCTGGTTCTTCCCTCACTTCGGACATCCCCAGCAGTATCGATCTAGCCACTGCCTTGATCACCGGGAAT
193 M A G S S L T S D I P S S I D L A T A L I T G N

649 GAGGTCCTCTTAAATGCGATGAAAGGTATGCAGATGCTTTCGGGTCAATCTCGATTTCACATGTGGAGGAT
217 E V L L N A M K G M Q M L S G S I S I S H V E D

721 GTATGCCGCGCCAAATGCTTGTGGCTGAAAAAGAATCGGCTTCTGGGCGTTACATTTGCTGTGCCGTC AAT
241 V C R A Q M L V A E K E S A S G R Y I C C A V N

793 ACTAGTGTTCCTGAGCTGGCTAAGTTCCTCGAGAAAAGATACCCCAATACAAAGTCCCTGCCGATTTTGG A
265 T S V P E L A K F L E K R Y P Q Y N V P A D F G

865 GATTCCCTCTTAAGGCAAAATTGATACTCTCATCGGAAAAGCTTACCAAGGAGGGGTTCAAGTTTAAAGT A
289 D F P S K A K L I L S S E K L I K E G F S F K Y

937 GGGATCAAAGAAATTTACGACGAATCTGTGGCCTACTTCAAGGCCAAAGGGTTACTGCAGAAC TGA
313 G I K E I Y D E S V A Y F K A K G L L Q N *

```

Figure 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *LjANR* and *rLjANR* gene. Pane indicates codon and termination codon, gray indicates different nucleotides and amino acids

测序后的 CDS 和 gDNA 序列提交 GSDS 2.0 后发现, *LjANR* 和 *rLjANR* 基因都含有 6 个外显子和 5 个内含子 (图 3), 且序列都符合真核生物典型的 GT-AG 法则。经分析比较发现, *LjANR* 和 *rLjANR* 基因的外显子在基因组序列上的位置不同, 如图 3 所示, 但 6 个外显子的长度是一致的, 均分别为 118、167、198、160、214、145 bp, 而内含子的长度存在较大差异, *LjANR* 基因的内含子长度分别为 306、83、166、236、224 bp, *rLjANR* 基因的内含子长度分别为 312、83、167、239、223 bp (图 3)。

3 *LjANR* 和 *rLjANR* 基因启动子的克隆及分析

启动子在基因表达调控中起到了关键作用, 为了明确 *LjANR* 和 *rLjANR* 基因潜在的调控机理, 分别以忍冬和红白忍冬基因组 DNA 为模板, 利用特异性引物 *PLjANR*-F/R 进行启动子扩增, 扩增后分别得到大约 1 200 bp 的条带 (图 1C)。将扩增产物经上述同样的方法测序后获得两个品种 *ANR* 基因的启动子序列分别为 1 170 和 1 164 bp, 序列比对发现两条启动子序列存在多处碱基的置换。利用 PlantCARE 数据库对启动子的顺式作用元件进行预测, 发现两个基因的启动子中所含的顺式作用元件是相同的, 如表 2 所示, 除了 TATA-box 和 CAAT-box 等基本元件外, 还含有大量的光响应元件 GT1-motif、Box 4、I-box 等, 非生物胁迫应答元件

WRE 3、STRE、ARE 等, 及激素应答元件 GARE-motif、CGTCA-motif、ABRE 等 (表 2)。以上表明, *LjANR* 和 *rLjANR* 基因启动子能够响应光调控、植物激素和逆境胁迫等外界环境的变化, 从而调控 *ANR* 基因的表达, 在忍冬的生长发育和环境胁迫响应过程中发挥重要作用。

4 *LjANR* 和 *rLjANR* 基因编码蛋白的生物信息学分析

通过在线网站分析可知, *LjANR* 和 *rLjANR* 基因编码的蛋白很相似, 仅存在很细微的差别。ProtParam 在线预测发现, *LjANR* 和 *rLjANR* 蛋白的分子量相似, 等电点均为 5.57, 且都属于稳定的疏水性蛋白 (表 3)。采用 SOPMA 在线工具分析预测 *LjANR* 和 *rLjANR* 蛋白的二级结构发现, 2 个蛋白质都主要由 α -螺旋和无规则卷曲构成, β -折叠所占比例最少 (表 3)。

NCBI CD-Search 分析发现, *LjANR* 和 *rLjANR* 蛋白结构域分析结果相同, 如图 4A 所示, 2 个蛋白都含有 3 个功能位点, 即活性位点、NADP 结合位点、底物结合位点, 具有类黄酮还原酶共有的保守结构域 FR-SDR-e [flavonoid reductase (FR), short-chain dehydrogenases/reductases (SDR), extended (e), 类黄酮还原酶-短链脱氢酶/还原酶] (图 4A)。

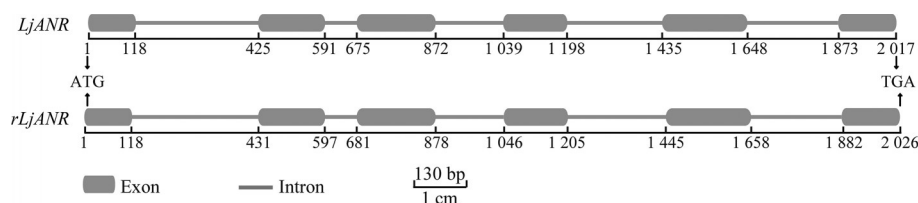


Figure 3 Genome structure analysis of *LjANR* and *rLjANR* gene

Table 2 *cis*-Acting elements in promoters of *LjANR* and *rLjANR*

Element name	Core sequence	Number	Function
TATA-box	ATATAT; TATATA; TATA; TATACA; TATAAAA; ATTATA; TATAAAT	78	Core promoter element around -30 of transcription start
CAAT-box	CAAAT; CAAT; CCCAATTT; CCAAT	20	Common <i>cis</i> -acting element in promoter and enhancer regions
GT1-motif	GGTTAA	1	Light responsive element
Box 4	ATTAAT	2	Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
I-box	gGATAAGGTG	1	Part of a light responsive element
Sp 1	GGGCGG	2	Light responsive element
GATA-motif	GATAGGA	1	Part of a light responsive element
G-Box	CACGTG; TACGTG	2	<i>cis</i> -Acting regulatory element involved in light responsiveness
MRE	AACCTAA	1	MYB binding site involved in light responsiveness
GARE-motif	TCTGTTG	1	Gibberellin-responsive element
CGTCA-motif	CGTCA	1	<i>cis</i> -Acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
ABRE	ACGTG; CACGTG	3	<i>cis</i> -Acting element involved in the abscisic acid responsiveness
ERE	ATTCATA; ATTTTAAA	2	Ethylene responsive element
WRE 3	CCACCT	2	Damage and defense response element
STRE	AGGGG	6	Osmotic stress response element
ARE	AAACCA	2	<i>cis</i> -Acting regulatory element essential for the anaerobic induction
MYB	CAACAG	1	MyB-binding site
MYC	CATTTG/CAATTG	4	MyC-binding site

Table 3 Physical and chemical properties and secondary structures analysis of LjANR and rLjANR proteins. pI: Isoelectric point; kD: Kilodalton; GRAVY: Grand average of hydropathicity

Protein	Physical and chemical property				Secondary structure/%				
	Amino acid number	pI	Molecular weight/kD	GRAVY	Instability index	Alpha helix	Random coil	Extended strand	Beta turn
LjANR	333	5.57	35.9063	0.017	26.46	41.74	36.34	14.41	7.51
rLjANR	333	5.57	35.9184	0.032	26.21	42.64	36.04	13.81	7.51

利用 ExPASy-ProtScale 在线工具的 Hphob./Kyte&Doolittle 算法对 LjANR 和 rLjANR 蛋白亲/疏水性分析发现, 2 个蛋白亲水 (负值) 和疏水 (正值) 性氨基酸的分布基本相同, 仅存在一处差异, 如图 4B 中的虚线椭圆所示。另外, 2 个蛋白的正值数量明显多于负值数量, 结合表 3 中 2 个蛋白总平均亲水性指数为正值, 推测 2 个蛋白质都是疏水性蛋白, 且都是在第 89 位氨基酸分值最高为 2.178, 疏水性最强, 第 40 和 41 位分值最低为 -2.633, 亲水性最强 (图 4B)。

通过 Signal P 4.1 Server 对信号肽预测发现, 2 个蛋白信号肽预测结果相同, 平均信号肽分值 (mean S) 均为 0.312, 低于 0.5 (图 4C), 表明 2 个蛋白质都不存在信号肽, 可能在合成处起作用, 不存在运输利用。

TMHMM 分析跨膜结构发现, LjANR 和 rLjANR 蛋白都不存在跨膜结构 (图 4D), 表明它们可能定位于与膜无关的结构。

5 LjANR 和 rLjANR 基因编码氨基酸序列同源性比对与系统进化分析

将 LjANR 和 rLjANR 基因编码的氨基酸序列分别在 NCBI 进行 BlastP 比对, 两者比对结果相似。以 LjANR 蛋白为例, 结果发现 LjANR 与中华猕猴桃、茶树、油茶、高大越橘、兔眼蓝莓中的 ANR 具有较高的同源性, 同源性分别为 83.83%、82.93%、83.23%、80.54%、80.84%。通过 DNAMAN 6.0 软件将上述氨基酸序列进行多重比对分析, 结果发现这 6 种植物 ANR 蛋白的总相似度高达 89.66%, 且它们具有高度保守的活性位

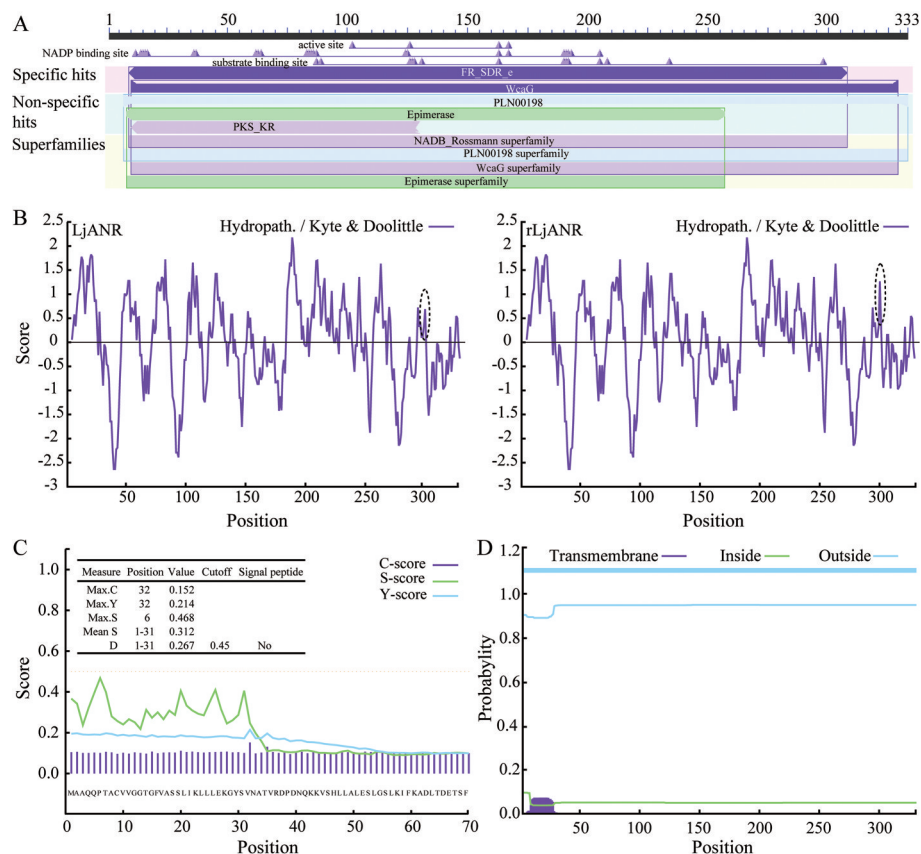


Figure 4 Bioinformatic analysis of LjANR and rLjANR proteins. A: Conserved domains prediction; B: Hydrophobicity analysis. The dashed ellipses indicate the difference of LjANR and rLjANR (>0 means hydrophobicity, <0 means hydrophilicity); C: Signal peptide prediction; C-score: Raw cleavage site score; S-score: Signal peptide score; Y-score: Combined cleavage site score; Mean S: Average S-score of possible signal peptides; D score: Discrimination score; D: Transmembrane structure prediction

点 A¹⁰²、S¹²⁶、Y¹⁶³、K¹⁶⁷ (图 5), 表明 ANR 蛋白在进化过程中是高度保守的。此外, 这些氨基酸序列 N 端含有一个高度保守的 NADP(H) 结合区 (G-G-X-G-X-A), 中间部分还有一个亮氨酸拉链区 (图 5)。

选取 GenBank 中注册的 19 种植物的 ANR 氨基酸序列, 利用 MEGA 6.0 软件采用邻接法构建 ANR 氨基酸序列的系统进化树 (图 6)。结果表明, 来源于不同植物的 ANR 蛋白表现出明显的种属特性, 同科植物大多以较高的置信度各自聚为一支, 此外, 同为无患子目的楝、香椿、荔枝、龙眼, 同为杜鹃花目的中华猕猴桃、油茶、越橘、兔眼蓝莓等各自聚在一个大分支里。LjANR 和 rLjANR 蛋白和山茶目山茶科的茶树, 杜鹃花目山茶科的油茶及杜鹃花目猕猴桃科的猕猴桃 ANR 蛋白聚为一个分支, 表明亲缘关系较近, 和豆科的紫苜蓿、百脉根、大豆等亲缘关系较远 (图 6)。

6 LjANR 和 rLjANR 基因的表达模式分析

为了解 ANR 基因在不同组织中的表达模式, 选取忍冬和红白忍冬根、茎、叶、花蕾 4 个组织的 cDNA 样品为模板, 进行荧光定量 PCR 分析。结果表明, 2 个品

种中的 ANR 基因都是在花蕾中的表达量最高, 根中的表达量最低, 且忍冬和红白忍冬花蕾中的表达量分别是根中的 387 和 173 倍 (图 7A)。

为进一步了解 ANR 基因的表达模式, 本研究还检测了 ANR 基因在忍冬和红白忍冬不同花期的表达量。金银花的花期大致可以分为幼蕾 S1、三青 S2、二白 S3、大白 S4、银花 S5、金花 S6、凋花 S7 等七个阶段^[28], 由于凋花期 RNA 易降解, 本研究选取了 S1-S6 期 cDNA 样品进行荧光定量 PCR 分析 (图 7C)。结果如图 7B 所示, ANR 基因在忍冬和红白忍冬不同花期具有相似的表达模式和变化规律, 都是在 S4 期表达量最低, S1 和 S2 期表达量相对较高。整体来看, 从 S2 期开始表达量呈逐渐下降趋势, 直至 S4 期达到最低, 之后在 S5 期有一个缓慢的上升后表达量再次下降 (图 7B)。

不同品种基因表达量分析发现, ANR 基因在忍冬和红白忍冬的根、S2 期、S5 期差异显著 ($P < 0.05$), 茎、花蕾、S1、S3、S6 期差异极显著 ($P < 0.01$), 且 ANR 基因在红白忍冬根、茎中的表达量明显高于忍冬, 而叶和花蕾中则相反, 忍冬花蕾中 ANR 基因的表达量是红白忍

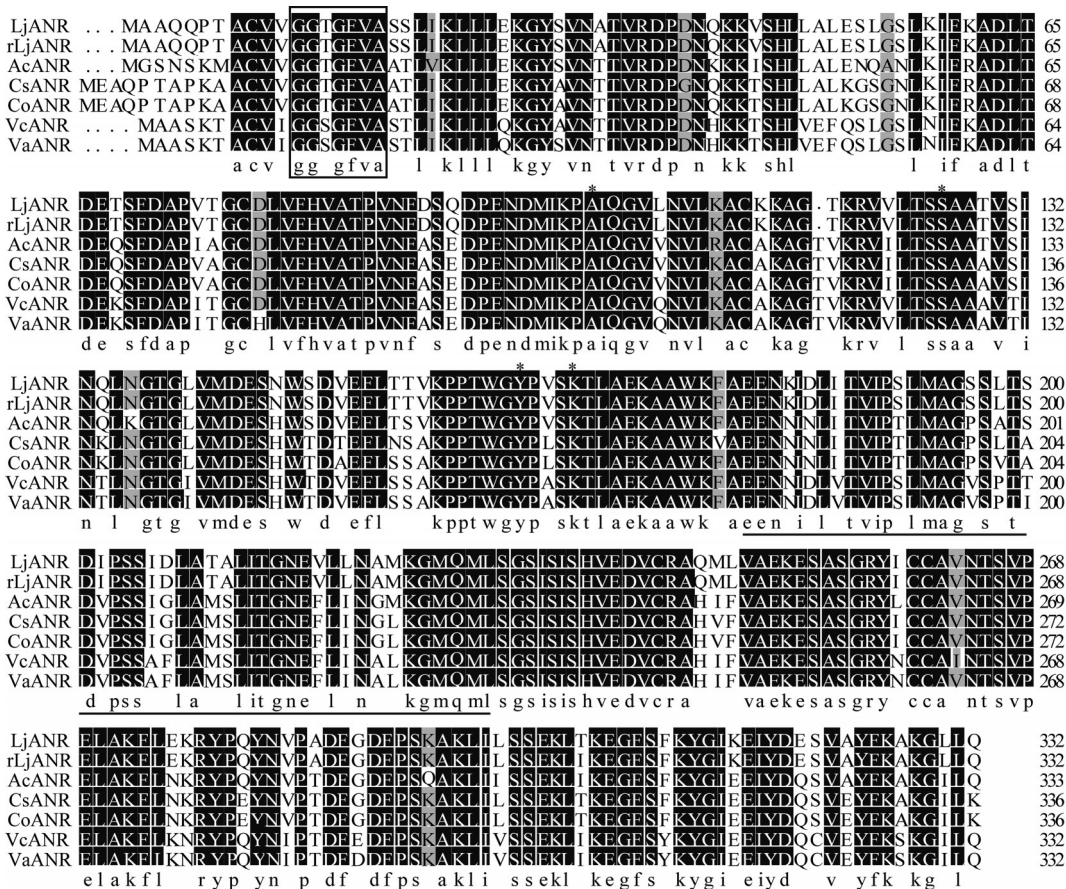


Figure 5 Multiple sequences alignment of LjANR and rLjANR compared with ANR proteins of other plants. Ac: *Actinidia chinensis* var. *chinensis* PSS10333.1; Cs: *Camellia sinensis* ADZ58166.1; Co: *Camellia oleifera* QBK50747.1; Vc: *Vaccinium corymbosum* AYC35398.1; Va: *Vaccinium ashei* BAM42668.1. The sequences in the boxes are NADP(H) binding sites, the underlined part is the Leucine zipper area, active sites are marked with *

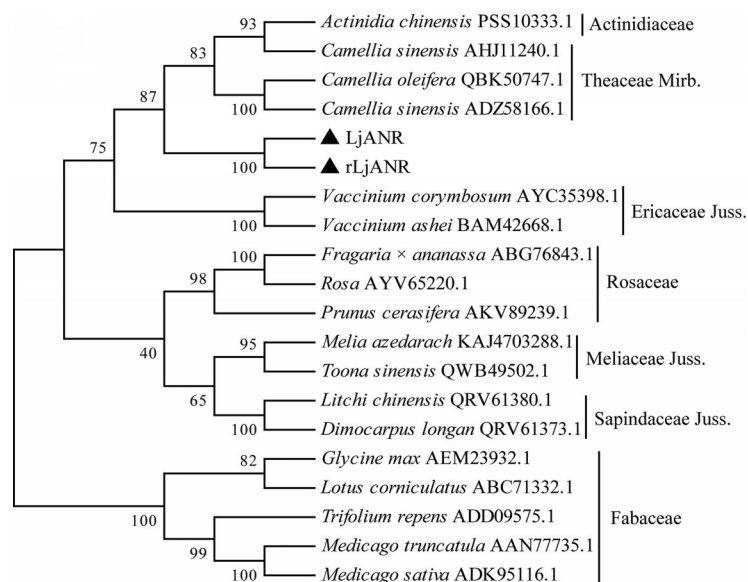


Figure 6 Phylogenetic tree of LjANR and rLjANR with ANR proteins from other plants

冬中的 2.24 倍左右 (图 7A 和图 7B)。

7 LjANR 基因的原核表达分析

LjANR 和 rLjANR 基因编码的蛋白仅有一个氨基酸的差异, 因此仅对 LjANR 蛋白进行了原核表达分析, 为后续研究 ANR 蛋白的功能奠定基础。将重组质粒 pET-32a-LjANR 转入表达宿主菌 BL21 (DE3), 在 25 °C 下加入 IPTG 进行诱导。SDS-PAGE 显示, 与对照相比, pET-32a-LjANR 在 60 kD 左右有一条明显的外源蛋白条带 (图 8A), 除去 23 kD 左右的融合表达标签, 实际诱导蛋白大概为 37 kD, 这和 ProtParam 在线预测的分子质量 35.9 kD 基本一致, 表明 LjANR 融合蛋白表达成功, 且从图 8A 可以看出, 随着诱导时间的延长, 融合蛋白表达量逐渐增加。

从图 8B 可以看出, 0.2 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 浓度即可

以诱导大量蛋白表达, 当 IPTG 浓度达到 0.6 mmol·L⁻¹ 时, 蛋白诱导量达最高, 继续增加 IPTG 的浓度, 蛋白表达量变化不大 (图 8B)。由图 8C 可以看出, 温度对上清中 LjANR 融合蛋白的表达量影响较大, 在 20 °C 时 LjANR 融合蛋白的表达量在超声破碎后的上清中最高, 表明该温度为 LjANR 融合蛋白的最佳诱导温度 (图 8C)。综上所述, LjANR 蛋白的最佳诱导条件可以是 0.6 mmol·L⁻¹ IPTG、20 °C 诱导 15 h。

讨论

忍冬是我国传统药用藤本植物, 已有数千年的历史, 也是国家卫生健康委员会公布的 110 种药食同源名录品种之一。与此同时, 忍冬也是一种备受追捧的观赏植物, 其花在发育的过程中会从绿色变成白色再

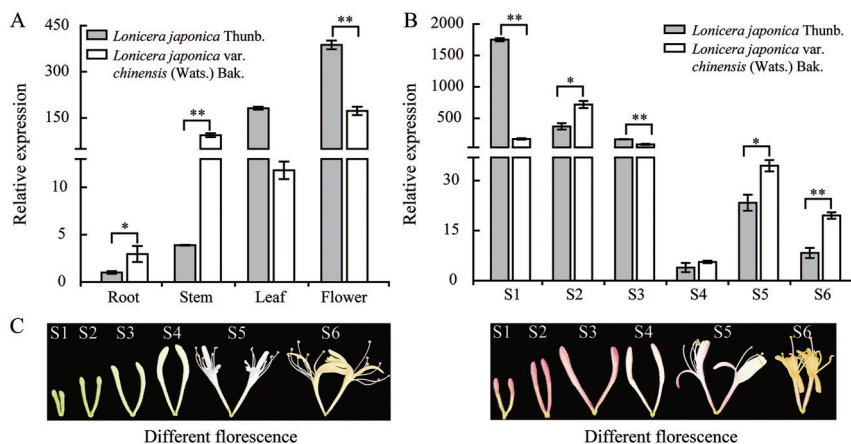


Figure 7 Expression pattern analysis of LjANR and rLjANR gene. A: Relative expression levels of LjANR and rLjANR gene in different tissues; B: Relative expression levels of LjANR and rLjANR gene in different florescence. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; C: Flowers at six stages (S1-S6) from *Lonicera japonica* Thunb. and *Lonicera japonica* var. *chinensis* (Wats.) Bak.

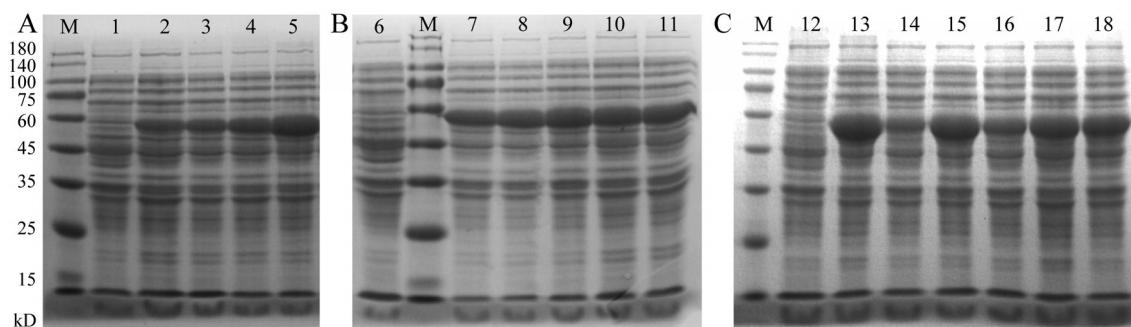


Figure 8 SDS-PAGE of the recombinant protein of LjANR. A: SDS-PAGE of expressed LjANR fusion protein with different induction times; B: SDS-PAGE of expressed LjANR fusion protein with different IPTG concentrations; C: SDS-PAGE of expressed LjANR fusion protein with different induction temperatures. 1, 6, 12: Before induction of pET-32a-LjANR; 2-5: 2, 3, 4, 15 h after 25 °C induction of pET-32a-LjANR; 7-11: Induction of 0.2, 0.4, 0.6, 1.0, 2.0 mmol·L⁻¹ IPTG; 13, 15, 17: Induction after 37, 25, 20 °C; 14, 16, 18: Supernatant of lysate after sonication on 37, 25, 20 °C; M: Protein molecular weight markers

变成金色。花青素是自然界存在的天然色素,在植物的生长发育和胁迫防御中发挥重要作用。花青素还原酶是花青素生物合成及调控途径的重要酶,对花青素含量的积累有重要影响。因此忍冬花青素还原酶的研究对于从基因水平上改善金银花的品质,提高金银花的经济价值有重要意义。

本研究成功克隆了忍冬和红白忍冬 *ANR* 基因的 CDS、gDNA 及启动子序列,分析发现 *LjANR* 和 *rLjANR* 的 CDS 序列仅存在 6 个碱基的差异,其编码的氨基酸仅有一个差异,gDNA 序列长度相差 9 个碱基,启动子序列长度相差 6 个碱基。这和同为忍冬科忍冬属的灰毡毛忍冬中 *ACS3* 基因的克隆结果是极其相似的,不同品种灰毡毛忍冬克隆获得的 *ACS3* 基因的 cDNA 序列有 7 个位点具碱基差异,编码氨基酸 1 个不同^[29]。此外,Yuan 等^[8]在红白忍冬中克隆的 *LjcDFR* 比忍冬中克隆的 *LjDFR* 多了 12 个碱基的插入,这和本研究的结果也是相似的。对 *LjANR* 和 *rLjANR* 基因编码的氨基酸序列进行生物信息学分析发现,和大多数 ANR 蛋白一样,其二级结构主要由 α 螺旋和无规卷曲组成, β 折叠较少^[20-22]。研究发现,大多数 ANR 基因含有 6 个外显子和 5 个内含子,如芸薹属 7 个 ANR 基因都含有 6 个外显子和 5 个内含子^[30],*MsBAN*^[31] 和芒果 *ANR*^[32] 也都含有 6 个外显子,5 个内含子,但也有少数例外,像银杏 *GbANR2*^[21] 及红花的 *CtANR2* 和 *CtANR3*^[24] 都含有 5 个外显子和 4 个内含子。本研究基因结构分析发现,*LjANR/rLjANR* 和大多数 ANR 基因一样含有 6 个外显子和 5 个内含子。

系统进化分析表明,*LjANR* 和 *rLjANR* 蛋白和山茶目山茶科的茶树,杜鹃花目山茶科的油茶及杜鹃花目猕猴桃科的猕猴桃 ANR 蛋白聚为一个大分支,表明亲缘关系较近,据报道茶树 ANR 蛋白可以催化矢车菊

色素生成儿茶素 EC,催化翠雀素生成 EGC^[33],油茶 ANR 蛋白能够催化矢车菊色素合成儿茶素和表儿茶素,催化飞燕草色素合成没食子儿茶素 (GC) 和没食子表儿茶素 (EGC)^[34]。因此,推测 *LjANR* 和 *rLjANR* 蛋白可能含有类似茶树、油茶 ANR 酶的功能,但仍需要进一步的功能验证。

表达量分析发现,*ANR* 基因在忍冬和红白忍冬花蕾中表达量最高,根中表达量最低,这和红花 *CtANR1/2* 在花中表达量最高,初期果球中表达量最低,*CtANR3* 苞片中最高,初期果球和根中几乎不表达的结果基本一致^[23,24]。而和 *MsBAN* 在花中几乎不表达,荚果中最高^[31]。表明植物 ANR 基因的表达在不同植物、同一植物的不同组织差异性很大。Yuan 等^[8]检测了忍冬和红白忍冬花蕾中花青素的含量,研究发现忍冬花蕾中检测不到花青素,而红白忍冬中检测到了 8 种不同的花青素,本研究中忍冬花蕾 *ANR* 基因的表达量明显高于红白忍冬花蕾 *ANR* 的表达量,是其 2.24 倍左右,两者是一致的,表明忍冬中的花青素可能被高表达的 *ANR* 还原合成了原花青素,可以通过进一步检测忍冬和红白忍冬中的原花青素的含量加以验证。Xue 等^[25]研究发现忍冬 S1 和 S2 期可以检测到花青素的含量,而其他时期检测不到花青素,本研究中 *ANR* 的表达也是在 S1、S2 期相对较高,这可能是由于底物对酶的合成有诱导作用。大量研究发现,受酶催化的底物常常可以诱导该酶的合成,这是生物界普遍存在的现象,这种诱导作用对于维持体内代谢物浓度的相对恒定有重要生理意义。如袁景丽等^[35]研究发现棉花 *GhANR* 和 *GhLAR* 可以促进纤维花青素的合成,具体表现为 *GhANR* 和 *GhLAR* 在棕色纤维的表达量极显著高于白色纤维中,且主要集中在纤维发育的 5-15 DPA 高表达。以上结果表明花青素还原酶对

花青素的含量不仅有负调控作用,在某些情况下,为了维持植物体内花青素浓度的相对恒定,也可以诱导花青素的合成。

综上所述,本研究成功克隆 *LjANR* 和 *rLjANR* 全长 CDS、gDNA 及启动子序列,对其进行基因结构、顺式作用元件及编码蛋白的生物信息学分析,并对其在忍冬和红白忍冬不同组织及不同花期的表达量进行分析,明确了其重组蛋白的最佳诱导表达条件,为进一步研究 ANR 基因的功能奠定了基础。ANR 基因作为花青素代谢途径的关键基因,对忍冬和红白忍冬花青素含量的积累有重要调控作用,关于其催化特性尚有待深入研究。

作者贡献: 余永亮和鲁丹丹负责本实验的设计、数据分析、论文初稿撰写;谭政委、杨红旗、李磊负责金银花的取样, DNA、RNA 的提取;许兰杰、杨青、董薇负责基因克隆、原核表达分析;安素妨、郭水柱、高松负责 qRT-PCR 等相关实验;梁慧珍负责论文思路设计、指导论文写作与修改。所有作者参与论文修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2020 Ed. Vol 1. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 173.
- [2] Yu JQ, Wang ZP, Zhu H, et al. Chemical constituents of *Lonicera japonica* roots and their anti-inflammatory effects [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 1110-1116.
- [3] Yoo HJ, Kang HJ, Song YS, et al. Anti-angiogenic, antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Lonicera japonica* extract [J]. J Pharm Pharmacol, 2008, 60: 779-786.
- [4] Shang X, Pan H, Li M, et al. *Lonicera japonica* Thunb.: ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 138: 1-21.
- [5] Liu X, Zhang M, He L, et al. Chinese herbs combined with western medicine for severe acute respiratory syndrome (SARS) [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2006, 10: CD004882.
- [6] Zhou Z, Li X, Liu J, et al. Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses [J]. Cell Res, 2015, 25: 39-49.
- [7] Zheng ZH, Wang K, Wei HL, et al. Antiviral effect of Fufang yinhua jiedu (FFYH) granules against coronavirus and its potential mechanism [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2022, 57: 1808-1815.
- [8] Yuan Y, Yang J, Yu XD, et al. Anthocyanins from buds of *Lonicera japonica* Thunb. var. *chinensis* (Wats.) Bak. [J]. Food Res Int, 2014, 62: 812-818.
- [9] Li XQ, Sun XH, Cai S, et al. Investigation on the chemical constituents and variation of the flower buds of *Lonicera* species by UPLC-ESI-MS/MS and principle component analysis [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2009, 44: 895-904.
- [10] Jaakola L. New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits [J]. Trends Plant Sci, 2013, 18: 477-483.
- [11] Tanaka Y. Flower colour and cytochromes P450 [J]. Phytochem Rev, 2006, 5: 283-291.
- [12] Liu KY, Wang ML, Xin HB, et al. Anthocyanin biosynthesis and regulate mechanisms in plants: a review [J]. Chin Agric Sci Bull (中国农学通报), 2021, 37: 41-51.
- [13] He J, Giusti MM. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties [J]. Annu Rev Food Sci Technol, 2010, 1: 163-187.
- [14] Gargouri M, Gallois B, Chaudiere J. Binding-equilibrium and kinetic studies of anthocyanidin reductase from *Vitis vinifera* [J]. Arch Biochem Biophys, 2009, 491: 61-68.
- [15] Pfeiffer J, Kuhnle C, Brandt J, et al. Biosynthesis of flavan 3-ols by leucoanthocyanidin 4-reductases and anthocyanidin reductases in leaves of grape (*Vitis vinifera* L.), apple (*Malus x domestica* Borkh.) and other crops [J]. Plant Physiol Biochem, 2006, 44: 323-334.
- [16] Xie DY, Sharma SB, Paiva NL, et al. Role of anthocyanidin reductase, encoded by *BANYULS* in plant flavonoid biosynthesis [J]. Science, 2003, 299: 396-399.
- [17] Lei Z, Xiao LJ, Yu MQ, et al. Metabolic characterization of the anthocyanidin reductase pathway involved in the biosynthesis of flavan-3-ols in Elite Shuchazao tea (*Camellia sinensis*) cultivar in the field [J]. Molecules, 2017, 22: 2241-2261.
- [18] Li H, Tian J, Yao YY, et al. Identification of leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase genes involved in proanthocyanidin biosynthesis in *Malus crabapple* plants [J]. Plant Physiol Bioch, 2019, 139: 141-151.
- [19] Ju ZG, Jiang MX, Wang WB, et al. Cloning and bioinformatics analysis of ANR gene in *Blumea balsamifera* [J]. Mol Plant Breed (分子植物育种), 2018, 16: 7270-7274.
- [20] Song Y, Liu HD, Wang HB, et al. Molecular cloning and functional identification of proanthocyanidin synthesis related genes *VcLAR* and *VcANR* of blueberry [J]. Jiangsu J Agric Sci (江苏农业学报), 2019, 35: 682-688.
- [21] Ji YF. Identification of key genes for flavonoid synthesis in *Ginkgo Biloba* and cloning of *GbANR2* gene [J]. Agric Technol Equ (农业技术与装备), 2022, (4): 64-66.
- [22] Sui JJ, Yang JX, Hu X, et al. Cloning and expression analysis of *TsANR* gene under temperature stress in *Toona sinensis* [J]. J Fuyang Nor Univ (Nat Sci Ed) (阜阳师范大学学报 自然科学版), 2021, 38: 57-61.
- [23] Lu DD, Tan ZW, Li L, et al. Cloning and expression analysis of anthocyanidin reductase gene ANR in *Carthamus tinctorius* L. [J]. Acta Agric Nucl Sin (核农学报), 2022, 36: 517-526.

- [24] Lu DD, Tan ZW, Yu YL, et al. Cloning, structure and expression profile analysis of *CtANR2* and *CtANR3* genes from *Carthamus tinctorius* L. [J]. Acta Agric Boreali Sin (华北农学报), 2023, 38: 84-93.
- [25] Xue Q, Fan H, Yao F, et al. Transcriptomics and targeted metabolomics profilings for elucidation of pigmentation in *Lonicera japonica* flowers at different developmental stages [J]. Ind Crop Prod, 2020, 145: 111981.
- [26] Liu XY, Chen L, Qiao YG, et al. Selection of reference genes by qRT-PCR inflower organ of *Lonicera japonica* Thunb. [J]. J Shanxi Agri Sci (山西农业科学), 2017, 45: 514-517.
- [27] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} method [J]. Methods, 2001, 25: 402-408.
- [28] Liu J, Zhang YL, Fu QF, et al. The optimum harvest time of *Lonicera japonica* [J]. Inf Tradit Chin Med (中医药信息), 2011, 28: 49-50.
- [29] Liu CY, Chen X, Chen Y, et al. Cloning, space-time expression and bioinformatics analysis of *ACS3* gene from different species of *Lonicera macranthoides* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2019, 50: 2154-2164.
- [30] Lin BB. Molecular Cloning and Comparative Genomic Analysis of *BANYULS* (*BAN*) Gene Family from *Brassica napus* and its Parental Species (甘蓝型油菜及其亲本物种 *BAN* 基因家族的克隆与比较基因组学分析) [D]. Chongqing: Southwest University, 2007.
- [31] Wang XM, Dong J, Jiang JS, et al. Cloning and bioinformatic analysis of *MsBAN* gene from *Medicago sativa* [J]. Chin J Grassland (中国草地学报), 2012, 34: 8-15.
- [32] Li XL, Zhao ZC, Gao AP, et al. Cloning and expression analysis of *ANR* gene from *Mango* [J]. Jiangsu Agric Sci (江苏农业科学), 2017, 45: 22-25.
- [33] Luo Y, Wang HX, Wang YS, et al. Expression and optimization of anthocyanin reductase gene of tea plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] in *Escherichia coli* [J]. J Tea Sci (茶叶科学), 2011, 31: 326-332.
- [34] Huang B, Li LB, Wu XJ, et al. Cloning and *in vitro* functional study of anthocyanin reductase gene from *Camellia oleifera* [J]. J Tea Bus (茶业通报), 2018, 40: 71-76.
- [35] Yuan JL, Zheng HL, Liang XL, et al. Influence of anthocyanin biosynthesis on leaf and fiber color of *Gossypium hirsutum* L. [J]. Sci Agric Sin (中国农业科学), 2021, 54: 1846-1855.